



## POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN DE FOSFATOS DE MATAS MICROBIANAS EPIBENTÓNICAS EN PASO SECO (ARGENTINA)

### POTENTIAL PHOSPHATE BIOREMEDIATION OF EPIBENTHIC MICROBIAL MATS FROM PASO SECO (ARGENTINA)

Perillo, Vanesa Liliana<sup>1,2,3</sup>; La Colla, Noelia Soledad<sup>1,2</sup>; Serra, Analía Verónica<sup>1,2</sup>; Pan, Jerónimo<sup>1,4,5</sup>; Botté, Sandra<sup>1,2,3</sup>; Cuadrado, Diana Graciela<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, Buenos Aires (C1033AAJ), Argentina, <sup>2</sup>Instituto Argentino de Oceanografía (IADO-CONICET-UNS). Camino La Carrindanga Km 7 E1, Bahía Blanca, Argentina, B8000CPB, <sup>3</sup>Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. San Juan 670 Piso 1, Bahía Blanca, Argentina, B8000ICN, <sup>4</sup>Instituto de Geología de Costas y del Cuaternario (IGCyC, UNMdP/CIC), Funes 3350, Nivel 1, Mar del Plata (7600), Buenos Aires, Argentina, <sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), Rodríguez Peña 4046, Mar del Plata (7600), Buenos Aires, Argentina, <sup>6</sup>Departamento de Geología, Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, Bahía Blanca, Argentina, B8000ICN

[vperillo@criba.edu.ar](mailto:vperillo@criba.edu.ar)

#### Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de biorremediación de matas microbianas de la planicie costera salina de Paso Seco (40°33'S; 62°14'O). Se colectaron muestras de matas microbianas epibentónicas (Junio 2018), que fueron trasladadas al laboratorio e incubadas en cámara de cultivo. Se procedió a tratar las muestras con dos condiciones experimentales: manteniendo la integridad ambiental de las mismas (ambiente) y luego de condiciones de autoclavado. Ambas condiciones fueron incubadas en agua de mar con y sin agregado de 5 mg P L<sup>-1</sup>. El análisis microbiológico de cianobacterias filamentosas demostró que la especie dominante en el primer milímetro del sedimento fue el morfotipo *Schizothrix* sp., mientras que en el milímetro subyacente los morfotipos dominantes fueron *Microcoleus chthonoplastes* y *Lyngbya* sp. Las matas correspondientes a la condición 'ambiente' tuvieron un mayor porcentaje de remoción de P del agua de incubación.

**Palabras clave:** biorremediación; fósforo; cianobacterias filamentosas; sedimentos marinos.

#### Introducción

La eutroficación, producida tanto de manera natural como antrópica, promueve el crecimiento de densas floraciones de algas nocivas que, no sólo reducen la calidad y la claridad del agua, sino que pueden aumentar de manera extrema el pH durante el día, consumir el carbono inorgánico disuelto en el agua por la elevada tasa fotosintética y tener otros efectos adversos en el ecosistema (Boyd y Tucker, 2012; Chislock, Doster, Zitomer, y Wilson, 2013; Turner y Chislock, 2010). A su vez, la descomposición de la materia orgánica fijada produce una hipoxia e incluso zonas anóxicas, lo que imposibilita la vida de la mayoría de los organismos acuáticos, generándose zonas despobladas en el agua, conocidas a nivel mundial como zonas muertas. Estas zonas son particularmente comunes en lagos de agua dulce y en zonas costeras donde desembocan grandes ríos ricos en nutrientes en todo el mundo (Diaz y Rosenberg, 2008; Dodds, 2006). Ello provoca graves consecuencias tanto en la salud pública, como en actividades económicas y recreativas.

La bioremediación de las zonas muertas es de vital importancia para disminuir y/o revertir los daños causados por la eutroficación. Se han estudiado e implementado distintas maneras de reducir la concentración de nutrientes como el P tanto en lagos como en zonas costeras (Perillo, 2016). Entre estas tecnologías, se encuentra la utilización de 'filtros verdes', algunos de los cuales utilizan plantas vasculares o bacterias por sus altas tasas de crecimiento y de captación de P (Álvarez Rogel y Jiménez Cárceles, 2004; Gouma, Fragoeiro, Bastos, y Magan, 2014; Martínez-Porchas, Martínez-Cordova, Lopez-Elias, y Porchas-Cornejo, 2014). Las asociaciones microbianas de archeas, bacterias y microorganismos eucariotas, junto con las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se producen como parte de la actividad

metabólica normal de estos microorganismos, conforman estructuras biosedimentarias conocidas como matas microbianas epibentónicas. Diversos estudios alrededor del mundo han demostrado que las matas microbianas presentan capacidades importantes de quelar metales y de absorber compuestos derivados del petróleo (Cohen, 2002; Nath, Chakraborty, y Bhattacharjee, 2014; Shukla, Mangwani, Rao, y Das, 2014).

En la planicie costera salina moderna de Paso Seco, San Blas, Buenos Aires, Argentina (40°33'S; 62°14'O), se ubica un antiguo canal de marea (Fig. 1) separado del mar por una espiga de arena, cuyo sedimento superficial está colonizado por matas microbianas de más 1 cm de espesor. El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de remediación de las matas microbianas presentes en sedimentos actuales de Paso Seco; y por ende, determinar su posible utilización como 'filtros verdes' para biorremediar zonas costeras impactadas por fertilizantes fosfatados.



Figura 8. Ubicación de la planicie Paso Seco junto con el sitio de muestreo (círculo rojo; 40°38'3.32"S; 62°12'24.85"O). Imagen de fondo provista por Google Earth.

## Materiales y Métodos

Las matas microbianas recolectadas en junio 2018 se mantuvieron en recipientes de acrílico (11 x 11 x 7.5 cm) cubiertos por una tapa del mismo material a manera de microcosmos experimentales. Los laterales y la parte inferior del recipiente fueron cubiertos con cinta de papel. Se recolectó y filtró (0,45  $\mu\text{m}$ ) agua del sitio, agregándosele  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a la mitad (5 mg P  $\text{L}^{-1}$ , valor 45 veces superior a lo encontrado normalmente en aguas contaminadas – (Spetter et al., 2015) para generar dos condiciones: 'P Ambiente' (sin agregado de P) y P Alto'. Asimismo, se realizaron dos tratamientos: manteniendo las matas tal como fueron colectadas en el sitio de estudio (n = 3) y autoclavándolas para esterilizarlas de microorganismos (n = 3) con el fin de eliminar los microorganismos vivos y perturbar la acción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) ('Ambiente' y 'Autoclavadas', respectivamente). Los microcosmos se incubaron bajo un fotoperiodo de luz/oscuridad de 10:14 hr simulado con lámparas LED, correspondiente al fotoperiodo invernal del sitio de estudio. Las tapas de acrílico disminuyeron la intensidad de la luz en un promedio de 7,0 %. Las muestras se incubaron a 15 °C durante el período de luz y a 5 °C durante el período de oscuridad. La temperatura variación de 3 °C  $\text{hr}^{-1}$ . La incubación se realizó por 21 días. Las matas Ambiente y Autoclavadas se regaron con las distintas aguas (sin y con P) y luego se recolectó el agua a los 14 y 21 días. Se recolectaron muestras de matas para determinaciones de clorofila *a* durante los días 0 y 14, y para la comunidad microbiana antes de la incubación, fijándose estas últimas en una solución de Lugol al 3 %. La medición de clorofila *a* se realizó según Stal *et. al* (1984). La biomasa, medida a través de la concentración de clorofila *a* en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de sedimento seco, se midió al inicio de la incubación (día 0) tanto en las matas Ambiente antes de ser tratadas con las soluciones de P Ambiente y P Alto, como en las Autoclavadas. Debido a la heterogeneidad que

tienen las matas microbianas, los valores de clorofila *a* del día 0 se midieron para cada tratamiento por separado para tener una mejor comparación del efecto de los tratamientos. Para el análisis de la comunidad microbiana las muestras fueron sonicadas por 10 min y luego transferidas a una cámara de conteo Sedgewick-Rafter y analizadas al microscopio. El agua se analizó para fósforo total (TP) en un ICP-OES (límite de detección: 0,05 mg P L<sup>-1</sup>).

## Resultados

El análisis microbiológico cuali-cuantitativo de morfotipos de cianobacterias por microscopía mostró que la especie dominante en el 1 mm superior del sedimento fue *Schizothrix* sp., seguida por *Oscillatoria* sp. y *Arthrospira* sp., y con presencia de *Phormidium* sp. En el siguiente mm, las cianobacterias dominantes fueron *Microcoleus chthonoplastes* y *Lyngbya* sp., encontrándose ocasionalmente *Oscillatoria*, *Pseudanabaena* sp., *Phormidium* y *Arthrospira*. En ambos milímetros, se encontró también presencia de diatomeas. La clorofila *a* en las matas autoclavadas fue un 79 % inferior a la hallada en las matas ambiente, porcentaje que se mantuvo luego de 14 días de incubación de las muestras ( $p < 0,0001$ ; Fig. 2a). No hubo diferencias significativas entre la biomasa de las matas Ambientes al considerar los distintos tratamientos de P, es decir, el agregado de P no produjo un crecimiento diferencial de los microorganismos. Sin embargo, el día 14 hubo crecimiento de biomasa estadísticamente significativo en ambos tipos de matas ( $p < 0,012$ ; Fig. 2a).

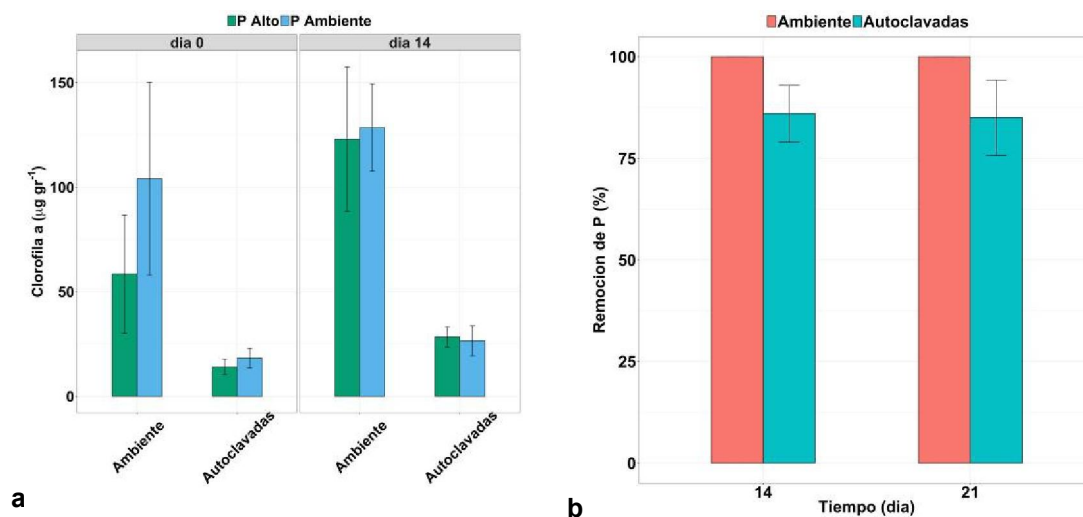


Figura 2. (a) Medición de biomasa en las distintas condiciones antes y en el día 14 de la incubación. (b) Remoción de P en las matas autoclavadas y ambiente a los días 14 y 21 en la condición de P Alto. Las barras de error corresponden al DS.

Luego de tratar las matas con P Alto, se observó que tanto en los días 14 como 21 de la incubación, las matas Ambiente fueron capaces de remover el 100 % del P agregado (hasta concentraciones por debajo del nivel de detección del método; Fig. 2 b). Se observó una eficiencia mayor al 75 % en la remoción del P en las matas autoclavadas; sin embargo, la eficiencia de remoción de las matas Ambiente fue estadísticamente significativamente mayor ( $p < 0,030$ ) a las de las matas Autoclavadas. Por el método utilizado, no se detectó presencia de P en las muestras de agua sin agregado de P en ninguna de las condiciones en los días 14 y 21. El leve aumento en clorofila *a* en matas autoclavadas al día 14 puede deberse a que originalmente el proceso de autoclavado no haya esterilizado un 100 % de los microorganismos autotróficos en el sedimento por un lado, y a que las incubaciones no se realizaron en un ambiente estéril. Es por esto, que la remoción de P del agua en la condición de Autoclavadas podría deberse a la sorción de P a los sedimentos y componentes varios que forman parte de las matas, mientras que el aumento de la eficiencia en las matas Ambiente podría deberse al consumo del P por parte del metabolismo microbiano. Sin embargo, las matas Ambiente mantuvieron una eficiencia ~25 % mayor a la de las matas autoclavadas tanto en el día 14 como en el día 21, por lo que se considera que la presencia de microorganismos y EPS intacto aumenta la eficiencia de remoción de P frente a un sustrato mayormente inorgánico.



## Conclusiones

Los resultados demuestran que en tres semanas las matas microbianas removieron el 100% del P agregado al agua de mar. Ello conlleva a concluir que las matas microbianas de la planicie de Paso Seco podrían ser útiles en la biorremediación de aguas contaminadas con fertilizantes ricos en P, actuando como 'filtros verdes'.

## Bibliografía

- Álvarez Rogel, J., y Jiménez Cárceles, F. J.** 2004. Nuevas técnicas en descontaminación y recuperación de aguas residuales: los humedales como filtros verdes.
- Boyd, C. E., y Tucker, C. S.** 2012. Pond aquaculture water quality management. Springer Science y Business Media.
- Chislock, M. F., Doster, E., Zitomer, R. A., y Wilson, A. E.** 2013. Eutrophication: causes, consequences, and controls in aquatic ecosystems. *Nature Education Knowledge*, 4(4), 10.
- Cohen, Y.** 2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *International Microbiology*, 5(4), 189–193.
- Diaz, R. J., y Rosenberg, R.** 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *science*, 321(5891), 926–929.
- Dodds, W. K.** 2006. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnology and Oceanography*, 51(1part2), 671–680.
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A. C., y Magan, N.** 2014. Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. En *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 301-323). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3>
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L. R., Lopez-Elias, J. A., y Porchas-Cornejo, M. A.** 2014. Bioremediation of Aquaculture Effluents. En *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 539-553). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00024-8>
- Nath, A., Chakraborty, S., y Bhattacharjee, C.** 2014. Bioreactor and Enzymatic Reactions in Bioremediation. En *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 455-495). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00020-0>
- Perillo, V. L.** 2016. Tecnologías emergentes para el control ambiental del fósforo. En R. S. Lavado (Ed.), *Sustentabilidad de los agrosistemas y uso de fertilizantes* (pp. 199-222). Asociación Argentina Ciencia del Suelo -FERTILIZAR Asociación Civil - Orientación Gráfica Editorial.
- Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., y Das, S.** 2014. Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 203-232). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>
- Spetter, C. V., Popovich, C. A., Arias, A., Asteasuain, R. O., Freije, R. H., y Marcovecchio, J. E.** 2015. Role of nutrients in phytoplankton development during a winter diatom bloom in a eutrophic South American estuary (Bahía Blanca, Argentina). *Journal of Coastal Research*, 31(1), 76–87.
- Stal, L. J., Van Gemerden, H., y Krumbein, W. E.** 1984. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 2(6), 295–306.
- Turner, A. M., y Chislock, M. F.** 2010. Blinded by the stink: nutrient enrichment impairs the perception of predation risk by freshwater snails. *Ecological Applications*, 20(8), 2089–2095.